

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the  
following application as filed with this Office.

Date of Application: June 2, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 166578/2000

Applicant(s): NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

April 20, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3032776



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JC903 U.S. PTO  
09/870821  
06/01/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-166578

出 願 人

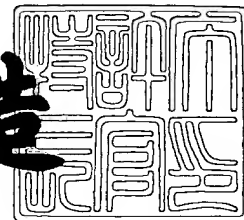
Applicant(s):

株式会社日本触媒

2001年 4月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3032776

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0420

【提出日】 平成12年 6月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 1/00

【発明の名称】 酵素反応方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

【氏名】 仙波 尚

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

【氏名】 ▲土▼▲橋▼ 幸生

【特許出願人】

【識別番号】 000004628

【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素反応方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵素として、水分含量 10 重量%以上の固定化酵素を用い、反応溶媒として、水と実質的に混和しない有機溶媒を用いて、溶液相が水又は水性緩衝液で飽和されているが相分離しない均一系となる条件で酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

【請求項 2】 固定化酵素として、シアン化水素とカルボニル化合物からシアノヒドリンを合成する活性を有する酵素であるヒドロキシニトリルリアーゼを固定化してなる固定化酵素を用い、カルボニル化合物を対応する光学活性シアノヒドリンに変換する反応を行う請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 固定化酵素の担体として、水分を保持する能力を有する担体を用いる請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 反応の最中に固定化酵素から反応溶液相に水分が移行しないように、反応溶液相に飽和量の水分が含まれている条件で反応を行う請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、固定化酵素を用いて有用物質を生産するための酵素反応方法に関する。

【0002】

【従来技術】

有機溶媒を反応溶媒として酵素反応を行うことは、水に難溶な基質や生成物の濃度を上げられるため有利であり、種々の酵素の反応系として使われてきている。しかし、酵素は水系環境では安定で活性も高いが、有機溶媒系では酵素タンパクの変性を起こしたりすることが多く、一般には不安定である。そこで、工業的に酵素反応を利用した有用物質の合成においては、反応系の構築は酵素の性質に左右され、高濃度反応をとるか、酵素の安定性を重視するかについてはケースに

よって異なっている。特に、ヒドロキシニトリルリアーゼを触媒として、シアン化水素とカルボニル化合物を基質として光学活性なシアノヒドリンを合成する方法において、本酵素は比較的有機溶媒中での安定性は高いが、反応系に水が存在しない場合には反応速度が顕著に低下する。よって、従来知られている有機溶媒系でのヒドロキシニトリルリアーゼの反応は反応時間が長いという問題があった。また、本酵素の基質となる芳香族系のカルボニル化合物は、水に対する溶解度が低く、本反応を水系で実施するのは基質及び生産物濃度が低いため、実用的ではない。

#### 【 0 0 0 3 】

これまで報告されている、ヒドロキシニトリルリアーゼを触媒に用いた光学活性シアノヒドリンを合成する反応系としては、水系、即ち水又は水性緩衝液に酵素及び基質を溶解させて反応を行う系（特公平 7 - 5 3 1 1 6 号公報）、極性溶媒と水と混合した溶媒系（Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 29, 419-425, 1988）、水又は水性緩衝液を飽和させた有機溶媒系（特開昭 6 3 - 2 1 9 3 8 8 号公報）、有機溶媒と水又は水性緩衝液を体積比で 1 / 5 から 5 / 1 で混合した二相系（特開平 5 - 3 1 7 0 6 5 号公報、Biocatal. Biotrans. Vol. 12, 255-266, 1995、特開平 1 1 - 2 4 3 9 8 3 号公報）などがある。

#### 【 0 0 0 4 】

水系の反応系の場合、基質であるアルデヒドやケトン等のカルボニル化合物が一般に水溶性が低く、基質濃度と生産物濃度を上げられずに効率がよくないという問題がある。極性溶媒と水とを混合した溶媒系では、純粋な水系よりは基質の濃度をやや増加させられるが、充分ではなく、また、極性溶媒は酵素の安定性に対して悪影響を与えやすいという問題がある。水又は水性緩衝液を飽和させた有機溶媒を使う方法では、基質及び生産物濃度を高くすることができる反面、水分含量が少なすぎるために反応速度が遅いという問題がある。有機溶媒と水の二相系では、反応速度が速く、基質及び生産物濃度を上げられる点では好ましいが、実際には、有機溶媒と酵素が直接接触するため、酵素や夾雑タンパク質が有機溶媒によって変性しやすく、変性したタンパク質によって有機相と水相の界面が分離しにくくなり、場合によりエマルジョン化してしまい、二相分離が困難になる

という問題があった。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、十分な反応速度かつ高濃度で目的生産物を合成できる固定化酵素反応系を提供することを目的とする。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、水分含量 10 重量%以上の固定化酵素を用い、水又は水性緩衝液で飽和させた、基質を含む有機溶媒系で反応を行うことによって、反応速度が速く、かつ高濃度の反応が可能であり、しかも反応後の酵素と反応液の分離回収も極めて容易である反応系が構築できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

即ち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 酵素として、水分含量 10 重量%以上の固定化酵素を用い、反応溶媒として、水と実質的に混和しない有機溶媒を用いて、溶液相が水又は水性緩衝液で飽和されているが相分離しない均一系となる条件で酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

(2) 固定化酵素として、シアン化水素とカルボニル化合物からシアノヒドリンを合成する活性を有する酵素であるヒドロキシニトリルリアーゼを固定化してなる固定化酵素を用い、カルボニル化合物を対応する光学活性シアノヒドリンに変換する反応を行う前記 (1) に記載の方法。

【 0 0 0 8 】

(3) ヒドロキシニトリルリアーゼが (R) - ヒドロキシニトリルリアーゼ又は (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼであり、非対称カルボニル化合物を対応する光学活性シアノヒドリンに変換する反応を行う前記 (2) に記載の方法。

(4) 固定化酵素の担体として、水分を保持する能力を有する担体を用いる前記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の方法。

(5) 反応の最中に固定化酵素から反応溶液相に水分が移行しないように、反応

溶液相に飽和量の水分が含まれている条件で反応を行う前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

【0009】

本発明は、反応系が有機溶媒の均一系であるため、基質及び生産物の濃度が上げられるばかりでなく、酵素は十分な水分を保持した固定化担体内に存在するため、酵素活性が充分発揮されて安定性も高い。更に、反応液との分離も、反応液がエマルジョン化することなく、清澄であり、固液分離を行うことによって非常に簡単になしうところが特徴である。反応系内にわずかに水分を存在させた有機溶媒系での反応系は、一般に有機溶媒微水系の酵素反応と呼ばれているが、この場合の水分含量は通常数%以下である。これに対し、本発明では水分が固定化酵素の内部に存在し、反応溶液中に水の相として存在して二相を形成しなければ、反応系全体に対する水分含量の上限は特に限定せず、むしろ固定化酵素中10重量%以上という、有機溶媒微水系に比べて多くの水分が存在する方が酵素反応に好ましいので、有機溶媒微水系とは全く異なっている。

【0010】

更に、本発明はヒドロキシニトリルリアーゼを触媒としてカルボニル化合物とシアン化水素とから光学活性なシアノヒドリンを合成する反応において特に好適に用いることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明に用いる酵素としては、特に制限はなく、有機溶媒を反応溶媒として用いることにより、反応効率が向上できる反応系に用いるものであれば使用することができる。このような酵素としては、水に難溶又は不溶な化合物が基質となる反応系の酵素触媒で、例えば、芳香族化合物の酸化還元を行う、モノオキシゲナーゼなどの酸化又は還元酵素、エステル化合物の合成、置換を行うエステラーゼなどのエステル加水分解酵素、水に難溶又は不溶な化合物への配糖化反応を行うグルコシダーゼなどの糖転移酵素、ニトリル化合物を加水分解するニトリルヒドラーターゼ、有機溶媒に易溶なカルボニル化合物を基質として光学活性シアノヒドリンを合成する反応を触媒するヒドロキシニトリルリアーゼなどが挙げられる。



特に、ヒドロキシニトリルリアーゼによる光学活性シアノヒドリン合成反応に好ましく用いることができる。

#### 【0012】

前記ヒドロキシニトリルリアーゼとは、シアン化水素とカルボニル化合物とから光学活性なシアノヒドリンを合成する活性を有するものを意味し、R体のシアノヒドリンを合成するヒドロキシニトリルリアーゼ（（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ）としては、アーモンド(*Prunus amygdalus*)などのバラ科植物由来の（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ、アマ科植物由来の（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ、S体のシアノヒドリンを合成するヒドロキシニトリルリアーゼ（（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼ）としては、モロコシ(*Sorghum bicolor*)などのイネ科植物由来の（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼ、キャッサバ(*Manihot esculenta*)、パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*)などのトウダイグサ科植物由来の（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼ、キシメニア(*Ximenia americana*)などのボロボロノキ科植物由来の（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼなどが例示できる。

#### 【0013】

前記酵素は酵素を含む生物組織からの抽出によって調製することができるが、前記酵素の遺伝子をクローニングし、当該遺伝子を組み込んで作成した遺伝子組換え生物によっても生産することができる。

#### 【0014】

本発明では、酵素及び水分を保持する場として固定化担体を使用する。この固定化担体としては、酵素及び水分を保持することができるものであれば、特に制限なく用いることができる。好ましい担体としては、親水性、又は担体内部に水又は水性緩衝液を保持することができる担体であって、例えば、多孔性の無機担体、セルロースなどの繊維分を含み、水分を保持できる担体、高分子化合物からなる担体などが挙げられ、具体的には、多孔性のセラミック粒子、多孔性のシリカゲル粒子、ゼオライト系粒子などの無機担体、寒天、アルギン酸カルシウム、キトサンなどの天然高分子ゲル、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコールなどの合成高分子ゲルなどが例示できるが、これらに限定される

ものではない。

【 0 0 1 5 】

本発明における酵素の固定化方法としては、特に制限はなく、例えば、担体に酵素液を吸収させる方法、酵素液と担体とを混合し、酵素を吸着固定する方法、酵素を包括固定化する方法、酵素を架橋剤で架橋する方法等が挙げられる。

本発明においては、固定化酵素の水分含量は、反応系（固定化酵素、水又は水性緩衝液、溶媒、基質及び生産物より構成される）全体に対する水分含量（％）が、基質及び／又は生産物を含んだ反応溶媒に溶解しうる飽和水分量（％）よりも多くなるようにすることが重要である。

【 0 0 1 6 】

前記の飽和水分量程度の水分では、酵素近傍の水分は実質的になく、反応速度が極めて遅くなる。一方、固定化酵素内部に保持できる水分量より大過剰の水分を投入してしまうと、溶液相が有機溶媒と水の二相系になり、固定化酵素の反応溶媒中での分散が悪くなり、反応効率が低下する。

実際には、用いる溶媒、温度条件、基質濃度条件によって溶媒に溶解する水の量は変動するので、用いる反応条件によって適宜選択することが好ましい。

【 0 0 1 7 】

本発明においては、反応原料の濃度を高め、生産性を高めるために、反応溶媒として、水と実質的に混和しない有機溶媒を用いる。ここで、「水と実質的に混和しない有機溶媒」とは、水に任意の割合で溶解する溶媒を除く有機溶媒を意味する。有機溶媒としては、水と実質的に混和せず、酵素反応に悪影響を与えないものであれば特に制限なく用いることができる。例えば、ヒドロキシニトリルリアーゼによる光学活性シアノヒドリンの合成においては、合成反応に用いる原料のアルデヒド又はケトンの物性、生成物であるシアノヒドリンの物性に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 1 8 】

水と実質的に混和しない有機溶媒としては、具体的には、ハロゲン化されていてもよい炭化水素系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素）、例えば、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサ

ン、ベンゼン、トルエン、キシレン、塩化メチレン、クロロホルムなど；ハロゲン化されていてもよいアルコール系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族アルコール、アラルキルアルコール）、例えば、*n*-ブタノール、イソブタノール、*t*-ブタノール、ヘキサノール、シクロヘキサノール、*n*-アミルアルコールなど；ハロゲン化されていてもよいエーテル系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族エーテル、芳香族エーテル）、例えば、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、*t*-ブチルメチルエーテル、ジメトキシエタンなど；ハロゲン化されていてもよいエステル系溶媒（例えば、直鎖状、分岐状又は環状の飽和又は不飽和脂肪族エステル、芳香族エステル）、例えば、ギ酸メチル、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、プロピオン酸メチル等が挙げられ、これらを単独で用いてもまた2種以上を混合して用いてもよい。

## 【 0 0 1 9 】

反応に用いる有機溶媒を単に水又は水性緩衝液で飽和させたものを反応に用いても、基質を本溶液に溶解すると水の溶解度が増す場合があり、固定化酵素から水分を奪ってしまう。このため、前記のような性質を有する基質を反応に用いる場合の水又は水性緩衝液を飽和させる処理は、基質を有機溶媒に溶解してから行う方が好ましい。

## 【 0 0 2 0 】

例えば、青酸を基質として用いる光学活性シアノヒドリンの合成方法においては、基質の青酸を有機溶媒に溶解してから水又は水性緩衝液で飽和させる処理を行う方が好ましい。即ち、所定濃度で青酸を有機溶媒に溶解した後、飽和量の水又は水性緩衝液を加えて混合する方法によって実施できる。また、前記の基質を溶解した有機溶媒中に溶解する水分量を予め測定しておき、飽和処理を行っていない有機溶媒と基質を反応系に添加した後、飽和量の水又は水性緩衝液を添加してもよい。ここで用いる水性緩衝液としては、酵素反応の至適pH付近に調整されていれば、特に制限はないが、例えば、リン酸、クエン酸、グルタル酸、リンゴ酸、マロン酸、*o*-フタル酸、コハク酸などの塩等によって構成されている緩衝液が挙げられる。

## 【0021】

例えば、反応溶媒として $\alpha$ -ブチルメチルエーテルを用い、基質としてベンズアルデヒド(1M)、青酸(シアン化水素酸)(1.5M)を用い、固定化ヒドロキシニトリルリアーゼを触媒として、反応温度20℃付近で光学活性シアノヒドリンの合成を実施する場合に、前記の反応系を構築するには、以下のような手法で系を構築することができる。

## 【0022】

## 1. 固定化酵素の調製

酵素液に固定化担体を投入し、酵素を吸着固定化するか、又は担体が吸収する水分以下の酵素液を固定化担体と混合して水分を10重量%以上含んだ固定化酵素を作成する。この際の水分含量は、固定化酵素内部に保持できる範囲、即ち、溶液相が有機溶媒の均一系になる範囲であれば、制限はなく、好ましくは10～60重量%、更に好ましくは20～50重量%である。また、酵素1単位(U; unit)に対する固定化酵素中の水分含量は、好ましくは0.1～100  $\mu$ L/U、更に好ましくは1～50  $\mu$ L/Uである。

## 【0023】

## 2. 反応系の構築

反応温度付近の温度で溶媒と青酸を予め混合した溶液に水又は水性緩衝液を加えて飽和させる。この条件での水の飽和溶解度はおよそ2重量%程度であるから、少なくともこの量以上の水又は水性緩衝液を反応液に含ませる方が好ましい。一方、固定化酵素は活性を発現するに充分であり、かつ、反応溶媒中で容易に分散させる程度の水分を含んだ状態のものを使用する。水分が過剰な場合は、反応液中への水分の添加量を少なく調整することで目的を達することもできる。また、固定化担体の水分がやや少ない場合には、固定化酵素を含む反応系に、水又は水性緩衝液をそのまま添加することによっても調整が可能である。

## 【0024】

## 3. 反応

反応系において、回分式で反応を行う場合には、攪拌などにより、固定化酵素が反応系内に分散するようにする。カラムなどに固定化酵素を充填して反応を行

う場合には、基質を含む溶液を適当な流速でカラムに流入させ、流出液を採取することで実施できる。回分反応の場合には、反応が完結した時点で混合を止め、固定化酵素を沈降させ、生産物が溶解している有機相を常法により取り出すことで生産物を回収できる。この固定化酵素は初回と同じ方法で調製した基質を含む溶液と混合することによって再使用することができる。

## 【0025】

本発明によって合成できる光学活性シアノヒドリンの反応基質としてはカルボニル化合物及びシアン化水素を用いる。

ここでカルボニル化合物とは、アルデヒド又はケトンをいい、具体的には、次式 (I) :

## 【0026】

## 【化1】



(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、互いに異なり、それぞれ水素原子又は炭素数22以下の1価の炭化水素基を表し、前記炭化水素基中、 $-CH_2-$ 並びに $-CH_3$ の $CH_2$ はカルボニル基、スルホニル基、 $-O-$ 又は $-S-$ で置き換えられていてもよく、 $=CH_2$ は $=O$ 又は $=S$ で置き換えられていてもよく、また $-CH_2-$ の $C-H$ 、 $-CH_3$ の $C-H$ 、 $>CH-$ の $C-H$ 、 $=CH-$ の $C-H$ 並びに $=CH_2$ の $C-H$ は、 $N$ 又は $C$ -ハロゲンで置き換えられていてもよく、また、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して非対称の2価の基を表してもよい。)

で示される。

## 【0027】

前記式 (I) において、炭素数22以下の1価の炭化水素基とは、直鎖状又は分岐状の鎖状炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある単環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある多環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のあるスピロ炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある環集合構造の炭化水素基、あるいは、前記の環式炭化水素基が置換した鎖状炭化水素基のいずれをも含む。また、飽和な炭化水素基並びに不飽和な炭化水素基のいずれをも含むが、不飽和な炭化水素基において、 $C=C=C$ のアレン構造を含む基は除く。直鎖状又は分岐状の鎖状炭化水素

基としては、例えば、飽和な鎖状炭化水素基である、炭素数 1 以上の直鎖状アルキル基、炭素数 3 以上の分岐状アルキル基、不飽和な鎖状炭化水素基である、炭素数 2 以上の直鎖状アルケニル基、炭素数 3 以上の分岐状アルケニル基、炭素数 3 以上の直鎖状アルキニル基、炭素数 4 以上の分岐状アルキニル基、炭素数 4 以上の直鎖状アルカジエニル基、炭素数 5 以上の分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。単環式炭化水素基としては、例えば、飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 3 以上の側鎖のないシクロアルキル基、総炭素数 4 以上の側鎖のあるシクロアルキル基、不飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキニル基、炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルカジエニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルカジエニル基などを例示することができる。不飽和な単環式又は多環式炭化水素基としては、芳香族炭化水素基、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、9-アントリル基など総炭素数 6～22 の側鎖のない芳香族基、総炭素数 7 以上の側鎖のある芳香族基、更には、環集合構造の炭化水素基でもある、炭素数 12 のフェニルフェニル基、総炭素数 13 以上の側鎖のあるフェニルフェニル基を例示することができる。また、多環式炭化水素基としては、炭素数 6 以上の側鎖のない縮合環式炭化水素基、総炭素数 7 以上の側鎖のある縮合環式炭化水素基、炭素数 7 以上の側鎖のない架橋環式炭化水素基、総炭素数 8 以上の側鎖のある架橋環式炭化水素基、総炭素数 9 以上の側鎖のないスピロ炭化水素基、総炭素数 10 以上の側鎖のあるスピロ炭化水素基などを例示することができる。なお、前記の側鎖のない縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 9 以上となるものを挙げることができ、前記の側鎖のある縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 10 以上となるものを挙げるができる。環集合構造の炭化水素基としては、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキリデンシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキリデンシクロアルキル基などを例示することができる。なお、これらの環式炭化水素において、側鎖のあるとは、環上に

鎖状炭化水素基が置換していることを意味する。前述する環式炭化水素基が置換した鎖状炭化水素基としては、総炭素数 7 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 12 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のないシ

クロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数9以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。

## 【0028】

なお、以下においては、側鎖のない芳香族基、側鎖のある芳香族基、並びに、フェニルフェニル基又は側鎖のあるフェニルフェニル基などを併せて、アリール基といい、このアリール基で置換された直鎖状又は分岐状のアルキル基をアラルキル基という。他の環式炭化水素基に関しても、特に明記しない場合、環上に側鎖のないものとあるものを併せて指す場合には、単にシクロアルキル基等の名称を用いる。鎖状炭化水素基についても、直鎖状のものと分岐状のものを併せて指す場合には、単にアルキル基等の名称を用いる。

## 【0029】

前記炭化水素基中、 $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、スルホニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換えられると、それぞれケトン、スルホン、エーテル又はチオエーテルの構造が導入され、 $-\text{CH}_3$ の $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換わると、それぞれホルミル基（アルデヒド）、水酸基又はメルカプト基に変わり、あるいは、末端の $=\text{CH}_2$ が $=\text{O}$ 又は $=\text{S}$ に置き換わると、ケトン、チオケトンの構造が導入されることを意味し、また、 $-\text{CH}_2-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}-$ となり、 $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $>\text{N}-$ となり、 $=\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{N}-$ となり、末端の $-\text{CH}_3$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}_2$ が導入され、 $=\text{CH}_2$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{NH}$ となる。また、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $=\text{CH}-$ 、 $\equiv\text{CH}$ 又は $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{C}-\text{ハロゲン}$ で置き換えられると、当該炭素上へハロゲン原子を置換することになる。なお、炭素鎖中における $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $\text{N}$ への置き換えは、当該炭化水素基に対する、それぞれオキサ置換、チア置換、アザ置換に当たり、例えば、炭化水素環の環の骨格炭素で起こると、炭化水素環のそれぞれ含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環への変換となる。該炭化水素基中、 $\text{CH}_2$ 並びに $\text{C}-\text{H}$ における置き換えは、それぞれ独立に行われてよく、加えて、前記の置き換えを行った後、なお当該炭素上に $\text{CH}_2$ 又は $\text{C}-\text{H}$ が残存する際には、更に置き換えがなさ



れてもよい。更には、前記の置き換えにより、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ の $-\text{CO}-\text{O}-\text{H}$ ；カルボン酸構造への変換などもなされる。

## 【 0 0 3 0 】

本明細書において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を指すが、フッ素原子、塩素原子、臭素原子が好ましい。

従って、前記炭化水素基としては、鎖状炭化水素基並びに環式炭化水素基など環構造を有する炭化水素基のいずれをも選択でき、例えば、飽和鎖状炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルキル基、不飽和鎖状炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルケニル基、直鎖状又は分岐状のアルキニル基、直鎖状又は分岐状のアルカジエニル基など、飽和な環式炭化水素基であるシクロアルキル基、不飽和な環式炭化水素基であるシクロアルケニル基、シクロアルキニル基、シクロアルカジエニル基など、芳香族炭化水素基であるアリール基、アラルキル基、アリーラルアルケニル基などが挙げられる。

## 【 0 0 3 1 】

更に詳しくいえば、直鎖状又は分岐状のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、1-メチルプロピル基、ペンチル基、1-メチルブチル基、ヘキシル基、1-メチルペンチル基、ヘプチル基、1-メチルヘキシル基、1-エチルペンチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、2-メチルプロピル基、2-メチルブチル基、3-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、4-メチルペンチル基、メチルヘキシル基、メチルヘプチル基、メチルオクチル基、メチルノニル基、1, 1-ジメチルエチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、2, 6-ジメチルヘプチル基、3, 7-ジメチルオクチル基、2-エチルヘキシル基など、シクロアルキルアルキル基としては、シクロペンチルメチル基、シクロヘキシルメチル基など、シクロアルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、メチルシクロペンチル基、シクロヘキシル基、メチルシクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基など、ビスシクロアルキル基としては、ノルボルニル基、ビスシクロ[2. 2. 2]オクチル基、アダマンチル基などが挙げられる。直鎖状又は分

岐状のアルケニル基としては、例えばビニル基、アリル基、クロチル基（2-ブテニル基）、イソプロペニル基（1-メチルビニル基）など、シクロアルケニル基又はシクロアルカジエニル基としては、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサンジエニル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアルキニル基としては、例えばエチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げられる。アリール基としては、例えばフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、2-フェニルフェニル基、3-フェニルフェニル基、4-フェニルフェニル基、9-アントリル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、トリメチルフェニル基、エチルフェニル基、メチルエチルフェニル基、ジエチルフェニル基、プロピルフェニル基、ブチルフェニル基などが挙げられる。アラルキル基としては、例えばベンジル基、1-ナフチルメチル基、2-ナフチルメチル基、フェネチル基（2-フェニルエチル基）、1-フェニルエチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基、フェニルペンチル基、フェニルヘキシル基、メチルベンジル基、メチルフェネチル基、ジメチルベンジル基、ジメチルフェネチル基、トリメチルベンジル基、エチルベンジル基、ジエチルベンジル基などが挙げられる。アリールアルケニル基としては、例えばスチリル基、メチルスチリル基、エチルスチリル基、ジメチルスチリル基、3-フェニル-2-プロペニル基などが挙げられる。

#### 【0032】

前記炭化水素基中の $\text{CH}_2$ がカルボニル基、スルホニル基、O又はSで、又はC-HがN又はC-ハロゲンで置き換えられた基としては、ケトン、アルデヒド、カルボン酸、スルホン、エーテル、チオエーテル、アミン、アルコール、チオール、ハロゲン、複素環（例えば、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環）などの構造を一つ以上含む基が挙げられる。なお、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環とは、環式炭化水素基の環骨格の炭素がそれぞれ酸素、硫黄、窒素で置き換わるものを意味し、更には、これらヘテロ原子置換が二種以上ある複素環であってもよい。前記の置換を有する炭化水素基としては、例えば、ケトン構造のアセチルメチル基、アセチルフェニル基；スルホン構造のメタンスルホニルメチル基；エーテル構造のメトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシ

エチル基、メトキシプロピル基、ブトキシエチル基、エトキシエトキシエチル基、メトキシフェニル基、ジメトキシフェニル基、フェノキシメチル基；チオエーテル構造のメチルチオメチル基、メチルチオフェニル基；アミン構造のアミノメチル基、2-アミノエチル基、2-アミノプロピル基、3-アミノプロピル基、2, 3-ジアミノプロピル基、2-アミノブチル基、3-アミノブチル基、4-アミノブチル基、2, 3-ジアミノブチル基、2, 4-ジアミノブチル基、3, 4-ジアミノブチル基、2, 3, 4-トリアミノブチル基、メチルアミノメチル基、ジメチルアミノメチル基、メチルアミノエチル基、プロピルアミノメチル基、シクロペンチルアミノメチル基、アミノフェニル基、ジアミノフェニル基、アミノメチルフェニル基；含酸素複素環のテトラヒドロフラニル基、テトラヒドロピラニル基、モルホリルエチル基；含酸素複素芳香環のフリル基、フルフリル基、ベンゾフリル基、ベンゾフルフリル基；含硫黄複素芳香環のチエニル基；含窒素複素芳香環のピロリル基、イミダゾリル基、オキサゾリル基、チアジアゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、ピラジニル基、テトラジニル基、キノリル基、イソキノリル基、ピリジルメチル基；アルコール構造の2-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシプロピル基、3-ヒドロキシプロピル基、2, 3-ジヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシブチル基、3-ヒドロキシブチル基、4-ヒドロキシブチル基、2, 3-ジヒドロキシブチル基、2, 4-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3, 4-トリヒドロキシブチル基、ヒドロキシフェニル基、ジヒドロキシフェニル基、ヒドロキシメチルフェニル基、ヒドロキシエチルフェニル基；チオール構造の2-メルカプトエチル基、2-メルカプトプロピル基、3-メルカプトプロピル基、2, 3-ジメルカプトプロピル基、2-メルカプトブチル基、3-メルカプトブチル基、4-メルカプトブチル基、メルカプトフェニル基；ハロゲン化炭化水素基である2-クロロエチル基、2-クロロプロピル基、3-クロロプロピル基、2-クロロブチル基、3-クロロブチル基、4-クロロブチル基、フルオロフェニル基、クロロフェニル基、ブロモフェニル基、ジフルオロフェニル基、ジクロロフェニル基、ジブロモフェニル基、クロロフルオロフェニル基、トリフルオロフェニル基、トリクロロフェニル基、フルオロメチルフェニル基、トリフルオロメチルフェ

ニル基；アミン構造とアルコール構造を有する 2-アミノ-3-ヒドロキシプロピル基、3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル基、2-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、2, 4-ジアミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3-ジアミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2, 3-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジアミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-3, 4-ジヒドロキシブチル基、アミノヒドロキシフェニル基；ハロゲンと水酸基で置換された炭化水素基であるフルオロヒドロキシフェニル基、クロロヒドロキシフェニル基；カルボン構造のカルボキシフェニル基などが挙げられる。

### 【0033】

$R^1$  及び  $R^2$  で表される非対称の 2 価の基としては、特に制限はなく、例えば、ノルボルナン-2-イリデン、2-ノルボルナン-5-イリデンが挙げられる。

前記式 (I) で示されるカルボニル化合物としては、例えば、ベンズアルデヒド、*m*-フェノキシベンズアルデヒド、*p*-メチルベンズアルデヒド、*o*-クロロベンズアルデヒド、*m*-クロロベンズアルデヒド、*p*-クロロベンズアルデヒド、*m*-ニトロベンズアルデヒド、3, 4-メチレンジオキシベンズアルデヒド、2, 3-メチレンジオキシベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、フルフラール等の芳香族アルデヒド；アセトアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、シクロヘキサンアルデヒド等の脂肪族アルデヒド；エチルメチルケトン、ブチルメチルケトン、メチルプロピルケトン、イソプロピルメチルケトン、メチルペンチルケトン、メチル (2-メチルプロピル) ケトン、メチル (3-メチルブチル) ケトン等の飽和脂肪族ケトン；メチル (2-プロペニル) ケトン、(3-ブテニル) メチルケトン等の不飽和脂肪族ケトン；(3-クロロプロピル) メチルケトン等のアルキル (ハロアルキル) ケトン；2-(アルコキシカルボニルアミノ)-3-シクロヘキシルプロピオンアルデヒド等の 2-(保護アミノ) アルデヒド；3-メチルチオプロピオンアルデヒド等のアルキルチオ脂肪族アルデヒドが挙げられる。

## 【 0 0 3 4 】

前記のアルデヒド又はケトン光学活性シアノヒドリンに変換するためには、シアン化水素を原料として用いるが、シアン化水素の供給方法としては液体として供給する方法、気体として供給する方法のいずれをも採用することができる。またシアン化水素だけではなく、シアン化水素の水溶液である、シアン化水素酸（即ち青酸）も全く同様に用いることができる。更に、反応系へ添加することによってシアン化物イオン（ $\text{CN}^-$ ）を生じる物質であれば用いることができ、例えば、シアン化ナトリウムやシアン化カリウムなどのシアン化水素酸の塩、アセトンシアノヒドリンなどのシアノヒドリン類などが挙げられる。

## 【 0 0 3 5 】

本発明に用いるヒドロキシニトリルリアーゼ酵素の調製は、酵素を含む植物組織からの抽出、酵素遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え生物を培養した培養物からの抽出によって行える。抽出は常法によって実施すればよく、調製物にはヒドロキシニトリルリアーゼ以外の成分が含まれていても反応に悪影響を与えなければ特に精製する必要はない。こうして調製したヒドロキシニトリルリアーゼ酵素を固定化することによって固定化酵素を得る。

## 【 0 0 3 6 】

固定化酵素の水分含量の測定は、乾燥状態の固定化担体と酵素固定化後の固定化酵素との重量の比率から求めることもできるが、カールフィッシャー水分計などを使用しても測定することができる。

## 【 0 0 3 7 】

固定化酵素及び基質の使用量、反応温度は、用いる基質に応じて適宜決定される。通常、固定化酵素の使用量は基質であるカルボニル化合物 5 0 mmol に対して 1 ～ 1 0 0 0 単位、好ましくは 1 0 ～ 5 0 0 単位である。基質の濃度は、カルボニル化合物の場合は通常 0 . 1 ～ 1 0 mol / L の範囲に設定し、シアン化水素は用いるカルボニル化合物に対して 1 ～ 5 倍モル、好ましくは 1 . 1 ～ 3 倍モルの濃度で添加する。本反応は基質濃度によって酵素活性及び反応速度が変化するので、用いるカルボニル化合物の種類に応じて適宜決定する。反応時間は、基質であるカルボニル化合物の転換率が 8 0 % 以上、好ましくは 9 0 % 以上に達するまでの

時間が適当であるが、この限りではない。反応温度は酵素の活性が十分発揮される温度であればよく、通常 0～40℃、好ましくは 4～30℃である。

#### 【0038】

本発明方法によって生成された光学活性シアノヒドリンなどの生成物は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などによって、測定、定量することができ、必要に応じて、抽出、減圧蒸留、カラム分離などの通常の手段によって分離精製することができ、長時間保存する場合には安定剤を添加してもよい。

#### 【0039】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

##### （調製例 1）（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

（1）アーモンド種子粉碎物 100g にアセトン 200ml を混合し、2 時間攪拌した後、濾過し、固形分を回収した。この固形分を乾燥したものに水 600g を加え、アンモニア水で pH 7.5 に調整した後、攪拌混合を一晩行った。次いで、このスラリーを遠心分離し、上澄液を回収した。この上澄液の pH を 5.5 に調整した後、遠心分離し、不溶分を除去した液を回収した。

#### 【0040】

（2）前記（1）で調製した（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液の活性を測定した。酵素活性は D L - マンデロニトリルを基質として基質が酵素によって分解されベンズアルデヒドが生成される速度を 249.6nm の吸光度変化を測定することによって測定し、活性を算出した。ここで、1 単位（U；unit）は 1 分間にベンズアルデヒド 1  $\mu$ mol を生成する活性と定義した。この方法で前記（1）で調製した酵素液の酵素活性を測定したところ、60.57U/ml の活性で酵素を 2.5 万単位回収することができたことがわかった。

#### 【0041】

##### （調製例 2）（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

（1）（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼは、酵母サッカロマイセス・セレビシエを宿主として、キャッサバ由来の当該遺伝子をクローニングしたものを当該

酵母へ遺伝子組換えして得た遺伝子組換え酵母を培養することによって調製した。当該遺伝子組換え酵母をYPD培地（酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%）1Lで24時間当該遺伝子組換え酵母を培養し、回収した菌体を破碎して不溶分を除去した液を回収した。

（2）前記（1）で調製した（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液の活性を調製例1（2）と同様の方法で測定したところ、40U/mlの活性があることがわかり、9000単位の酵素を回収することができた。

#### 【0042】

##### （調製例3）固定化（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

調製例1の方法で調製した（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液を硫酸沈澱処理し、酵素を濃縮し、1000U/mlの酵素液を調製した。この酵素液1mlに対して1gの固定化担体（多孔性シリカゲル、microbead silicagel 300A、富士シリシア化学製）を混合した。これをそのまま合成反応に用いることにした。この固定化酵素の水分含量は50重量%であった。

#### 【0043】

##### （調製例4）固定化（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

調製例2の方法で調製した（S）-ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液に、酵素活性300単位に対して調製例3と同じ固定化担体1gを添加し、緩やかに一晚混合した。次いで、濾過して固定化酵素を回収し、これを以降の反応に用いた。こうして調製した固定化酵素の水分含量をカールフィッシャー水分計で測定したところ、水分含量50重量%であることがわかった。

#### 【0044】

##### （実施例1）（R）-シアノヒドリンの合成

アーモンド由来の（R）-ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液1000U/ml 6mlと多孔性シリカゲルmicrobead silicagel 300A（富士シリシア化学製）6gを混合し、固定化酵素を調製した。水分量と反応効率の関係を調べるために、同様の操作によって調製した固定化酵素をエバポレーターで3時間減圧乾燥した後、10mMリン酸緩衝液（pH5.5）を添加して水分含量を調整したものを作成した。表1に示した条件4においては、10mMリン酸緩衝液（pH5

. 5) で酵素濃度を 1 / 2 に希釈して、酵素量は同じであるが酵素液量を 2 倍にした酵素液を、他の条件の 2 倍量の固定化担体に固定化した固定化酵素を用いた。

## 【 0 0 4 5 】

検討に用いた未処理 t - ブチルメチルエーテル (TBME) 中の水分含量は 0 . 0 3 重量%であり、1 0 mMリン酸緩衝液 (p H 5 . 5) で飽和させたものの水分含量は 1 . 3 4 重量%であった。この溶媒を前記緩衝液で飽和させた条件及び飽和处理しない条件を設定し、反応系全体の水分含量を変化させた。

## 【 0 0 4 6 】

いずれの条件においても、基質である 2 - クロロベンズアルデヒド (o - クロロベンズアルデヒド) と青酸の濃度はそれぞれ 1 M 及び 1 . 5 M と一定にした。前記において調製した固定化酵素 6 0 0 単位分を、それぞれ 1 0 m l の反応容器に入れ、次いで溶媒 4 . 1 4 3 m l、青酸 0 . 2 9 2 m l を添加した。ここへ、2 - クロロベンズアルデヒド 0 . 5 6 5 m l を添加することによって反応を開始した。反応は、2 5 ℃で反応容器をボトルローラーで緩やかに攪拌することで実施した。条件及び結果を表 1 に示す。

## 【 0 0 4 7 】

【表 1】

条件	固定化酵素 の水分含量 (重量%)	反応溶媒	反応系内の 水分量* (v/v%)	反応 5 時間後 のアルデヒド 転換率 (mol%)
1	0.76	未処理の TBME	0.96	6.3
2	0.76	緩衝液飽和 TBME	1.86	6.7
3	50	緩衝液飽和 TBME	12.8	95.3
4	50	緩衝液飽和 TBME	24.8	96.8

$$* \frac{\text{反応系内の水分 (vol)}}{\text{反応液 (有機相) (vol)}} \times 100$$

## 【 0 0 4 8 】



この結果から、緩衝液で飽和させた溶媒を用いても、反応効率が低く、溶媒の飽和水分量に対して過剰の水分を含んだ反応系において高い反応効率を得られた。条件 3 及び 4 では、反応溶媒が含有しうる水分量に比べ大過剰の水分を加えているにもかかわらず、反応溶液相は二相分離せず、有機溶媒相の単一相で形成されていた。

## 【 0 0 4 9 】

## (実施例 2)

調製例 1 で使用した固定化担体の水分保持量は重量のほぼ 1 倍であったので、酵素量は同じにし、担体量を変化させることで反応系内の水分含量を変化させた条件を設定し、水分含量と反応効率との関係を調べた。調製例 3 の方法で調製した固定化酵素を減圧乾燥し、水分を除去したものに 1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 5 . 5 ) を加えて水分量を調整した固定化酵素を作成し、水分含量と反応効率との関係を調べた。

## 【 0 0 5 0 】

6 0 0 単位の ( R ) - ヒドロキシニトリルリアーゼを固定化し、水分含量の異なる固定化酵素を調製した。一方、青酸を *t* - ブチルメチルエーテルに溶解し、1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 5 . 5 ) を飽和量添加した。次いで、固定化酵素に前記の原料液を添加した後、2 - クロロベンズアルデヒドを添加した。この反応系の有機相は 5 m l であり、青酸の濃度は 1 . 5 M、2 - クロロベンズアルデヒドの濃度は 1 M であった。この混合物を 2 5 ° C で緩やかに混合することで反応を行い、5 時間後の 2 - クロロベンズアルデヒドの ( R ) - 2 - クロロマンデロニトリルへの転換率を測定したところ、図 1 に示す結果が得られた。この結果、固定化酵素の水分含量が高いほど、反応効率が高いことがわかった。

## 【 0 0 5 1 】

## (実施例 3)

*t* - ブチルメチルエーテル 6 1 0 g に青酸 4 1 g を添加した溶液に 0 . 2 M クエン酸緩衝液 (p H 7 ) を 4 0 m l 加えて攪拌し、静置後、有機相を回収した。この有機相に調製例 4 の方法で調製した固定化酵素 ( 6 万単位 ) を添加した。この時の固定化酵素の水分含量は 5 0 重量 % であった。次いで、ベンズアルデヒド

を 1 0 6 g 添加後、反応混合物を攪拌し、反応を開始した。反応温度は 2 0 ℃ に設定した。H P L C で反応液の分析を行ったところ、1 時間後に ( S ) - マンデロニトリルが 1 2 6 g 生成していることがわかった。この時のアルデヒドの転換率は 9 3 %、( S ) - マンデロニトリルの光学純度は 9 9 % e e であった。次いで、反応終了後、固定化酵素を回収し、同様の条件で繰り返して反応を行ったところ、1 6 回の反応において平均転換率 9 4 . 2 % で光学純度 9 9 % e e 以上の ( S ) - マンデロニトリルを合成することができた。この結果から、固定化酵素に水分を保持させて反応を行うことによって、非常に効率よく、かつ安定に光学活性シアノヒドリンの合成が行えることがわかった。

【 0 0 5 2 】

【発明の効果】

本発明によれば、非常に効率よく、かつ安定に目的生産物を合成できる。

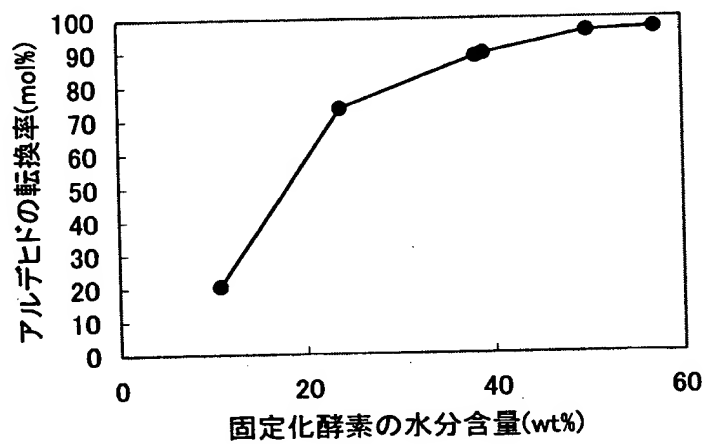
【図面の簡単な説明】

【図 1】

固定化酵素の水分含量と反応効率との関係を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 十分な反応速度かつ高濃度で目的生産物を合成できる固定化酵素反応系を提供する。

【解決手段】 酵素として、水分含量 1 0 重量%以上の固定化酵素を用い、反応溶媒として、水と実質的に混和しない有機溶媒を用いて、溶液相が水又は水性緩衝液で飽和されているが相分離しない均一系となる条件で酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004628]

1. 変更年月日 1991年 6月11日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒
2. 変更年月日 2000年12月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒